

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année scolaire 1926-1927. — N° 78

Emploi des Milieux à l'Esculine en Bactériologie

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 23 mai 1927

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

SARDA Henry

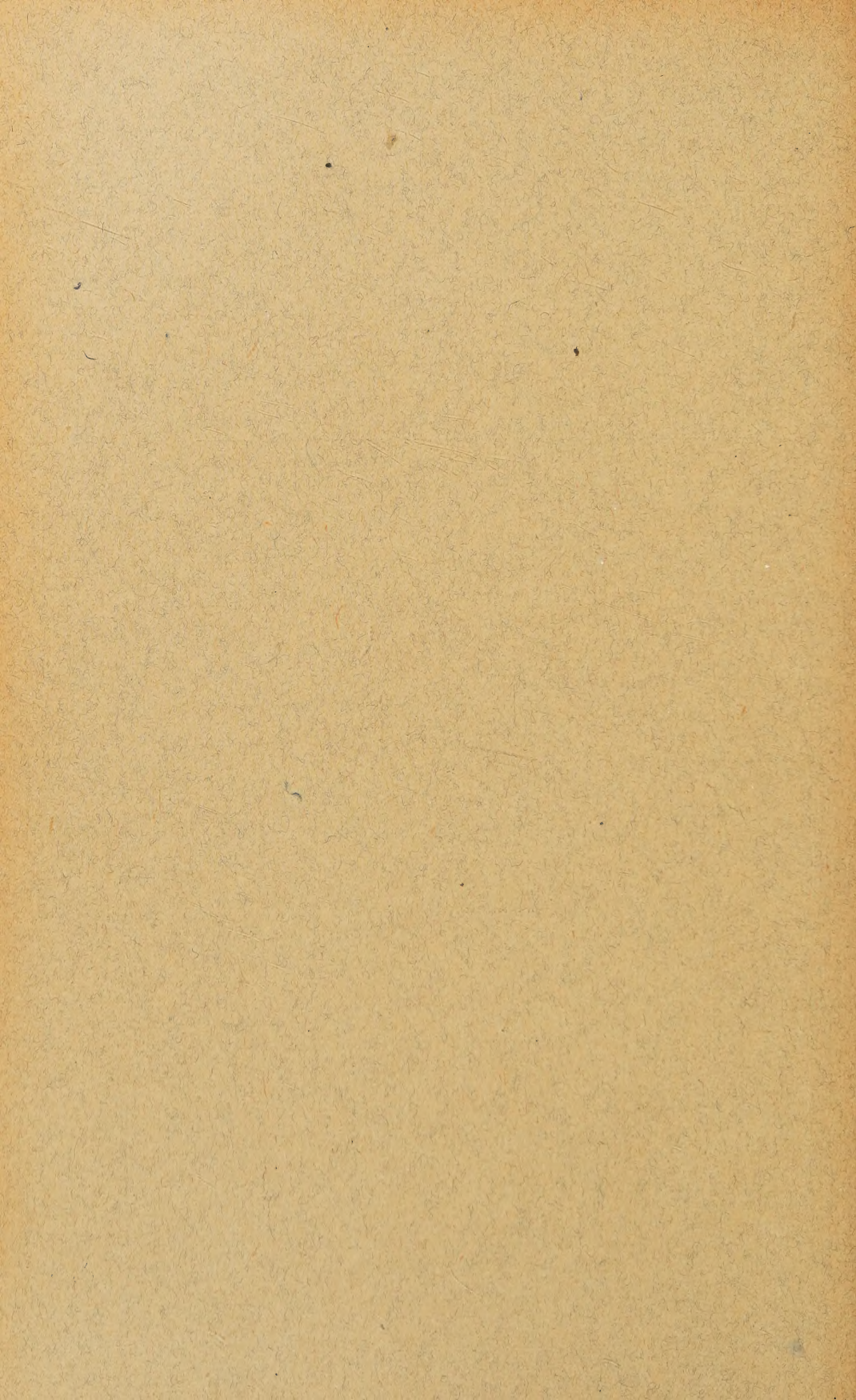
Diplômé d'Hygiène et de Microbiologie

Né le 28 Décembre 1896, à Annonay (Ardèche).

LYON

EDITIONS DU SERVICE PHOTOGRAPHIQUE
DE L'UNIVERSITÉ

—
1927



EMPLOI DES MILIEUX A L'ESCULINE
EN BACTÉRIOLOGIE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année scolaire 1926-1927. — N° 78

Emploi des Milieux à l'Esculine en Bactériologie

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 23 mai 1927

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

SARDA Henry

Diplômé d'Hygiène et de Microbiologie

Né le 28 Décembre 1896, à Annonay (Ardèche).

LYON

EDITIONS DU SERVICE PHOTOGRAPHIQUE
DE L'UNIVERSITÉ

—
1927

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire.....	M. HUGOUNENQ.
Doyen.....	M. J. LEPINE.
Assesseur.....	ROLLET

Professeurs honoraires

MM. AUGAGNEUR, CAZENEUVE, ROQUE.
FLORENCE (A.).

Professeurs

Cliniques médicales.....	}	BARD.
Cliniques chirurgicales		PIC.
Clinique obstétricale et accouchements.....	}	TIXIER.
Clinique ophtalmologique.....		BERARD.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....		X.
Clinique neurologique et psychiatrique.....		ROLLET.
Clinique des maladies des enfants.....		NICOLAS.
Clinique des maladies des femmes.....		LEPINE (J.).
Clinique d'oto-rhino-laryngologie.....		MOURIQUAND.
Clinique des maladies des voies urinaires.....		VILLARD.
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie.....		LANNOIS.
Physique biologique, radiologie et physiothérapie.....		ROCHET.
Chimie biologique et médicale.....		NOVE-JOSSERAND.
Chimie organique et toxicologie.....		CLUZET.
Matière médicale et botanique.....		HUGOUNENQ.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.....		MOREL.
Anatomie.....		BRETIN.
Histologie.....		GUIART.
Physiologie.....		LATARJET.
Pathologie interne.....		POLICARD.
Pathologie et thérapeutique générales.....		ROYON.
Anatomie pathologique		COLLET.
Chirurgie opératoire.....		CADE.
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie.....		PAVIOT.
Médecine légale.....		PADEL.
Hygiène.....		ARLOING (F.).
Thérapeutique, hydrologie et climatologie.....		ETIENNE MARTIN.
Pharmacie.....		COURMONT (P.).
		SAVY
		LEULIER.

Professeurs titulaires sans chaire

Chargé d'un cours de	Pathologie externe.....	VALLAS.
—	Propédeutique de gynécologie... ..	CONDAMIN.
—	Chimie minérale.....	BARRAL.
—	Urologie.....	GAYET.

Chargés de cours complémentaires

Anatomie topographique.....	THÉVENOT (Léon).
Puériculture et hygiène de la première enfance.....	RHENTER.
Chirurgie expérimentale.....	TAVERNIER.
Stomatologie.....	TELLIER.

Agrégés

MM.	MM.	MM.	MM.
GARIN.	ROUBIER.	DUNET.	DUFOURT.
TRILLAT.	FAVRE.	CHALIER (André).	DUMAS.
SARVONAT.	BONNET.	CHALIER (Joseph).	GABRIELLE.
FLORENCE (G.)	RHENTER.	NOEL.	MANCEAU.
ROCHAIX.	MAZEL.	CHEVALLIER.	MARTIN (Joseph).
CORDIER (V.)	SANTY.	DEVIC.	ROCHET (Ph.).
			WERTHEIMER.

M. BAYLE, secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. Paul COURMONT, Président ROCHAIX, Assesseur;
M. DUFOURT et M. J. CHALIER, Agrégés.



La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni improbation ni approbation.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE VÉNÉRÉE

A MES PARENTS

*Faible témoignage de notre très grande
affection et de notre reconnaissance infinie.*

A MA FEMME

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL COURMONT
PROFESSEUR D'HYGIÈNE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

*Nous le remercions très vivement de nous
avoir fait le grand honneur d'accepter la
présidence de notre jury, et de nous avoir
toujours accueilli avec tant de bienveillance
dans son service.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ A. ROCHAIX
INSPECTEUR DÉPARTEMENTAL D'HYGIÈNE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

*Il a bien voulu nous inspirer le sujet de notre
thèse et nous guider de ses conseils. L'accueil
que nous avons trouvé auprès de lui, nous fait
un devoir agréable de le prier d'accepter ici
l'hommage de notre profonde gratitude.*

A MES JUGES

A TOUS MES MAÎTRES
DES HOPITAUX ET DE LA FACULTÉ

CHAPITRE PREMIER

Historique.

L'esculine est, comme on le sait, un glycoside extrait du marron d'Inde.

Il semble que c'est en 1908, pour la première fois, que deux auteurs canadiens, HARRISON et VAN DER LECK, à la recherche d'une méthode précise pour la détection du colibacille dans l'eau et dans le lait, songèrent à employer cette substance pour la constitution de leurs milieux de culture. Dans deux mémoires qu'ils publièrent, l'un en 1908, l'autre en 1915, ils s'attachèrent à montrer tout le parti que l'on paraissait pouvoir tirer de l'emploi de ce glycoside et conclurent que les milieux de culture à l'esculine donnaient des résultats bien supérieurs à ceux obtenus par les méthodes classiques pour la recherche du colibacille.

Sans vouloir entrer ici dans le détail des expériences comparées qui leur permirent d'apporter de semblables conclusions, signalons, cependant, qu'ils utilisèrent, au cours de leurs recherches, deux milieux, l'un solide, l'autre liquide sur la constitution desquels nous aurons à revenir au cours de travail.

Ensemencées sur ces milieux, les colonies de colibacille prenaient une coloration noirâtre à l'exclusion de la plupart des autres germes intestinaux et notamment du *Bacillus Cloacæ Jordani*. Le *B. lactis aërogenes* seul présentait une réaction analogue, mais l'aspect très particulier de ses cultures leur permettait toujours une identification facile.

En 1910, en Amérique, Oscar KLOTZ et RANKIN cherchèrent à contrôler les résultats obtenus par les Canadiens. Mais les expériences auxquelles ils se livrèrent ne leur permirent pas de conclure à la constance de la méthode. Sur 62 échantillons de bactéries intestinales de l'homme (la plupart représentant des colibacilles), 22 fois ils obtinrent une réaction positive (teinte noirâtre de la colonie et du milieu environnant) et 40 fois, une réaction négative (aucune modification de la coloration primitive). L'emploi des milieux préconisés par HARRISON et VAN DER LECK ne leur donna donc pas satisfaction pour l'isolement et la recherche du colibacille, et des autres microbes intestinaux. Les diverses bactéries qu'ils étudièrent en outre sur ces milieux leur fournirent des résultats variables : le *Proteus Vulgaris*, le *Bacillus cloacæ Jordani*, le Paratyphique B, le Bacille d'Eberth leur donnèrent à peu près constamment une réaction négative, tandis que le *Bacillus lactis aërogenes* et le *B. mucosus* se montrèrent capables de produire la coloration caractéristique.

Deux ans plus tard, un bactériologiste allemand, LÖNNIS, appliqua au lait un procédé basé sur l'emploi de l'esculine, utilisant dans ce but un milieu de culture légèrement différent de celui des auteurs précités.

En 1916, au cours d'une grave épidémie dysentérique qui lui permit d'isoler un grand nombre de microbes intestinaux, Aimée HOROWITZ précisa que le *Proteus Vulgaris* reste sans action sur les milieux à l'esculine tandis que le *Bacillus cloacæ Jordani* en provoque toujours le dédoublement.

Devant les conclusions assez différentes des auteurs précités, il nous paraissait intéressant de reprendre la question et de chercher quel parti l'on pouvait tirer de l'emploi de l'esculine pour le diagnostic différentiel d'un certain nombre de bactéries.

CHAPITRE II

Etude de la réaction chimique et technique de la préparation des milieux de culture

L'esculine, glycoside extrait de l'écorce du marron d'Inde, se présente sous la forme de cristaux prismatiques d'un blanc éclatant. Dans les solutions, elle est d'une belle fluorescence bleue qui augmente par addition d'alcali et disparaît par addition d'acides.

Sous l'influence des acides étendus (SO^3H^+ , HCl à l'ébullition) ou de certains ferments (émulsine), cette substance se dédouble en glucose et en esculétine :



Cette faculté de dédoublement de l'esculine peut être utilisée en bactériologie pour la recherche ou la diagnose de diverses espèces microbiennes.

Certaines bactéries, en effet, se montrent capables de produire la décomposition du glycoside, alors que, dans des conditions d'expériences absolument identiques, d'autres ne jouissent aucunement de cette propriété. Cette

différence d'action entre des bacilles, quelquefois très voisins par leurs autres caractères biochimiques ou sérologiques, est due vraisemblablement à la sécrétion par certains d'entre eux de ferments solubles qui dédoublent l'esculine en glucose et en esculétine.

Quel que soit d'ailleurs le phénomène intime qui se passe dans la réaction, celle-ci peut-être aisément interprétée macroscopiquement et permettre parfois d'établir ou de confirmer un diagnostic différentiel entre quelques espèces microbiens.

Pratiquement, comment utiliser l'esculine ?

Puisque le dédoublement du glycoside, sous l'influence des bactéries « hydrolysantes » aboutit à la formation du glucose et de l'esculétine, diphénol complexe, il sera possible de procéder à la recherche de ces deux substances.

Nous décrirons succinctement la constitution des milieux de culture qui permettront, les uns de déceler la présence du glucose, les autres celle de l'esculétine.

A) Recherche du glucose :

Pour cette recherche, nous avons utilisé un milieu liquide, l'eau *peptonée esculinée tournesolée*, constitué de la manière suivante :

Pour 1000 grammes d'eau, ajouter :

Peptone (Chapoteaut) 30 grammes

Sel marin 10 grammes

Faire dissoudre à feu doux en agitant. Porter à l'ébullition. Alcaliniser légèrement par la soude. Puis stériliser à 120°, pendant une demi-heure.

Faire réduire par ébullition à 100 cm³, 150 cm³ de teinture de tournesol (Givaudan-Lavirotte), quantité nécessaire pour un litre d'eau peptonée. Puis ajouter 1 gr. d'esculine (Poulenc). Souvent ce milieu rougit ou reste sans coloration. Alcaliniser alors avec une solution de soude jusqu'à obtention d'une belle teinte bleue, fluorescente. Le milieu ainsi obtenu est filtré par pression sur bougie Chamberland F, et recueilli dans des flacons de Wolff. La répartition en tubes se fait aseptiquement peu de temps avant l'utilisation.

Les tubes à essai, ainsi préparés, sont ensemencés avec un demi-centimètre cube environ d'une culture microbienne en eau peptonée âgée de 24 heures, et portés à l'étuve à 37°5. Si la réaction est positive, au bout de 24 ou 48 heures selon les cas, le milieu a perdu sa fluorescence et pris une coloration rouge vif intense qui persiste les jours suivants en brunissant légèrement. Si la réaction est négative, le milieu conserve sa fluorescence et sa teinte bleue primitive, même après un séjour très prolongé à une température de 37°5.

Comment interpréter les phénomènes observés ?

Dans les cas où la réaction est positive, l'interprétation est toujours facile. Sous l'influence des ferments contenus dans les corps microbiens ensemencés, le glycoside est dédoublé en esculétine et en glucose ; cette dernière substance est alors fermentée par le microbe qui, acidifiant le milieu, lui donne la teinte rouge caractéristique.

Une réaction négative peut tenir à deux causes : ou bien le bacille expérimenté ne produit pas le dédoublement de l'esculine (aucune modification à la teinte primi-

tive du milieu n'apparaît) — ou bien la décomposition du glycoside s'effectue, mais l'agent bactérien se montre incapable de produire la fermentation du glucose libéré et l'acidification du milieu qui en résulte. Pour conclure d'une façon formelle, il faut donc, dans ce dernier cas, obtenir la certitude que la bactérie ensemencée possède la propriété de fermenter le glucose. Si les recherches effectuées à ce sujet ne permettent pas de l'affirmer, on ne peut tirer aucune conclusion certaine d'une semblable réaction.

Au cours de nos expériences, nous n'avons employé que rarement l'eau peptonée esculinée tournesolée. Les résultats positifs que nous avons obtenus par cette méthode ont été confirmés en tous points par ceux que nous ont donnés les procédés utilisés pour la recherche de l'esculétine. Mais à cause des inconvénients signalés plus haut, nous préférons procéder à la recherche du diphénol, pour obtenir rapidement et sûrement une réaction précise qui nous permette d'établir ou de confirmer un diagnostic hésitant jusqu'alors.

B) Recherche de l'esculétine :

Cette recherche est basée sur la propriété que possède l'esculétine, diphénol complexe, de se combiner avec le citrate de fer pour produire une coloration brune ou noirâtre. On peut utiliser, dans ce but, soit un milieu liquide, soit un milieu solide.

a) eau peptonée citratée esculinée :

HARRISON et VAN DER LECK proposent un milieu ayant la composition suivante :

Peptone de Witte	1 à 2 %
Taurocholate de soude (commercial)	0,5 %
Esculine (Merck)	0,1 %
Citrate de fer	0,05 %
Eau	100 cent. cubes

Après ébullition de 15 à 30 minutes, on filtre soigneusement le milieu que l'on répartit ensuite dans des tubes à essai.

LÖNNIS utilise simplement un bouillon avec :

Esculine	0,5 0/00
Citrate de fer	0,5 0/00

(ce bouillon n'est pas stérilisable à l'autoclave.)

C'est ce milieu liquide que nous avons employé au cours de nos expériences.

Sous l'influence de certains éléments microbiens, — on verse dans les tubes à essai un demi-centimètre cube environ d'une culture en eau peptonée de 24 heures —, ce bouillon, d'une teinte légèrement brunâtre, prend une coloration brune très foncée et même le plus souvent franchement noire. A l'étuve à 37°,5 la réaction apparaît au bout de quelques heures, et se complète généralement en moins de 24 heures ; à la température du laboratoire elle se manifeste beaucoup plus tardivement, et deux jours sont parfois nécessaires pour la voir se développer nettement.

Ensemencé avec d'autres bactéries, le milieu, au contraire, ne subit aucune modification de sa teinte primitive, même après un séjour prolongé à 37°. L'interprétation du processus chimique est facile.

Dans le premier cas, sous l'action des ferments microbiens, l'esculine se dédouble en glucose et en esculé-

tine ; le diphénol libéré se combine alors au citrate de fer pour produire la coloration noire caractéristique.

Dans le deuxième, la bactérie ne possédant pas la propriété de transformer le glycoside, aucun changement n'apparaît.

Les résultats obtenus par cette méthode — contrôlés systématiquement par ceux que nous a donnés l'emploi du milieu solide —, quoique intéressants, ne nous ont pas paru d'une précision absolue. Dans certains cas, le noircissement restait tellement faible, même après comparaison avec un tube témoin, qu'il était difficile de dire s'il s'agissait d'une réaction positive ou d'une réaction négative. Du reste, la coloration brônâtre de l'eau peptonée esculinée pure prenant un aspect plus foncé sous la seule influence d'un séjour prolongé à l'étuve, la distinction devenait d'autant plus artificielle que la lecture se faisait plus tardivement.

Aussi, pour procéder rapidement et sûrement à la recherche de l'esculétine, nous préférons utiliser le milieu solide préconisé par HARRISON et VAN DER LECK.

b) *Gélose citratée esculinée*

Suivant la méthode des auteurs canadiens, on la prépare de la manière suivante :

Faire bouillir jusqu'à dissolution :

Gélose	15 gr.
Sels biliaires (commerciaux) ...	2 gr. 5
Peptone de WITTE	10 gr.
Eau distillée	1000 cm ³

Neutraliser avec une solution de soude normale. Refroidir au-dessous de 60°, ajouter deux blancs d'œuf ou

une quantité suffisante d'une solution d'albumine ; porter à l'ébullition et filtrer dès que l'albumine est bien coagulée. Essayer l'acidité et neutraliser s'il est nécessaire, puis ajouter au filtrat chaud et clair :

Esculine (Poulenc)	1 gr.
Citrate de fer	1 gr.

Quand ces substances sont dissoutes, essayer l'acidité avec une solution décimale de soude. On devra trouver environ +0,6, puisque une solution d'un gramme de citrate de fer dans 1000 cm³ d'eau donne une acidité de +0,56. Si l'acidité est trop élevée, ajouter de l'alcali jusqu'à ce que la réaction soit de +0,6 ; si l'acidité est trop faible, ajouter encore du citrate de fer jusqu'à ce que la réaction soit de +0,6.

Le milieu ainsi obtenu, de coloration gris bleuâtre et légèrement fluorescent est mis en tubes et stérilisé à l'autoclave par la technique habituelle.

L'ensemencement — en tubes ou en boîtes de PETRI — des colonies microbiennes prélevées sur gélose âgées de 24 heures, se fait en points séparés avec l'anse de platine.

Lorsque la réaction est positive, c'est-à-dire, lorsque l'esculétine provenant du dédoublement du glycoside se combine au citrate de fer, on voit apparaître autour de la colonie, elle-même de coloration noirâtre, un cercle brun foncé qui passe très rapidement au noir. Puis se développe dans le milieu environnant cette teinte caractéristique. La réaction se produit à l'étuve à 37°,5 et commence en général au bout de quelques heures. Dans la plupart des cas, en moins de 24 heures, on obtient un noircissement intense de toute la gélose. Cer-

tains bactéries, toutefois, à pouvoir fermentatif moindre, ne produisent le noircissement qu'au bout de deux ou trois jours.

Lorsque la réaction est négative, c'est-à-dire lorsque l'esculine n'est pas décomposée par l'organisme microbien, la colonie se développe avec son aspect normal et le milieu environnant conserve sa teinte primitive.

Mais les réactions ne se présentent pas toujours avec des caractères aussi typiques et aussi faciles à interpréter.

Certaines colonies bactériennes, prennent une coloration brune grisâtre et provoquent un léger brunissement du milieu environnant. D'autres, sans produire de noircissement net, présentent une teinte rouge-brunâtre. Parfois la colonie devient jaune, tandis qu'un cercle grisâtre se forme autour d'elle. Dans ces cas atypiques, la gamme colorée s'étend du jaune au noir plus ou moins intense.

Doit-on considérer comme « positives » ces diverses réactions ? Dans leur mémoire, Oscar KLOTZ et RANKIN le pensent ainsi. Pour nous, ces aspects variés, nous paraissent également bien dus à une véritable décomposition de l'esculine ; mais comme nous n'avons jamais dans ces cas, observé la coloration noire caractéristique, malgré la multiplicité des expériences, nous avons qualifié ces résultats de « douteux ».

A côté de ces réactions dans lesquelles la colonie microbienne présente toujours une légère modification de sa teinte primitive, avec une auréole plus ou moins étendue, diversement colorée, il faut signaler l'existence

de celles qui provoquent une altération du milieu sans entraîner de changement de coloration de la colonie elle-même.

Autour de la colonie qui se développe avec son aspect normal, on ne constate pas de cercle plus ou moins foncé ; mais le milieu tout entier présente une teinte brune uniforme.

Ce brunissement qui se manifeste tantôt rapidement tantôt lentement semble tenir à des causes qu'il est assez difficile de déterminer avec exactitude.

Parfois, il apparaît en dehors de toute culture microbienne, ainsi qu'on peut s'en rendre compte en laissant séjourner à l'étuve pendant 5 ou 6 jours un tube d'agar esculiné sur lequel aucun ensemencement n'a été fait. La réaction, qui, du reste ne se produit pas d'une façon constante, est toujours tardive et discrète et sans analogie avec la teinte noire caractéristique due au dédoublement du glycoside.

D'autres fois, la coloration brune de la gélose se développe sous l'influence de la culture ensemencée. Elle apparaît alors au bout de 24 ou 48 heures de séjour à l'étuve ; généralement plus foncée que dans le cas précédent, elle n'apporte cependant aucune modification à l'aspect normal de la colonie. Ce brunissement, totalement différent de la coloration noire intense due à l'action de l'esculétine formée sur le fer tient sans doute à l'action de l'hydrogène sulfuré formé sur les sels de fer contenus dans le milieu.

Pratiquement, l'interprétation des résultats obtenus au moyen de la gélose citratée à l'esculine, nous paraît

assez simple. La plupart du temps on observera la réaction typique telle que l'ont décrite HARRISON et VAN DER LECK. Dans les cas peu fréquents où l'on obtiendra une coloration variable de la colonie et du milieu environnant, on devra penser à un dédoublement probable de l'esculine, mais ne pas l'affirmer. Enfin, en présence d'un milieu gardant son aspect normal ou prenant seul une teinte légèrement brune et uniforme on concluera nettement à une réaction négative.

Peut-être est-ce à une interprétation un peu différente de leurs expériences que les auteurs canadiens doivent d'avoir obtenu des résultats que ne confirmèrent pas les travaux des bactériologistes qui reprirent la question dans le but de déceler la présence de colibacilles dans l'eau et d'en pratiquer la numération ?

Pour mettre en évidence le dédoublement du glycoside, divers moyens s'offrent donc à nous. L'emploi de l'eau peptonée tournesolée à l'esculine nous permettra en général de déceler la présence du glucose. Quant à la recherche de l'esculétine, plus intéressante, elle pourra s'effectuer au moyen du bouillon citraté à l'esculine ou de la gélose esculinée.

Mais après avoir comparé la valeur respective de ces différentes méthodes, nous donnons nettement la préférence au milieu solide qui nous fournira aussi rapidement et plus sûrement une réaction susceptible d'être retenues pour le diagnostic différentiel de certaines espèces microbiennes.

CHAPITRE III

Application des milieux à l'esculine à la détection des colibacilles dans l'eau et dans le lait.

La recherche du colibacille, indice de pollution fécale dans l'eau et dans le lait, est, on le sait, de première importance.

Les méthodes pour sa détection et son dosage (colimétrie) sont nombreuses, et, pour l'eau, on a maintenant des moyens commodes et sûrs (Méthode de VINCENT, de DIENERT, etc...). Mais, pour le lait, il n'en va pas de même, les méthodes qui donnent de bons résultats pour les eaux n'étant pas applicables à ce liquide complexe, en raison soit de ses qualités physiques, soit des réactions chimiques connexes, qui viennent troubler la réaction caractéristique, révélatrice du Colibacille.

Devant la difficulté du problème, le nouveau procédé préconisé par HARRISON et VAN DER LECK, et basé sur l'emploi de l'esculine, méritait de retenir l'attention.

C'est ainsi qu'en 1923, ROCHAUX, cherchant à vérifier les résultats obtenus par les Canadiens, étudia l'action

d'un grand nombre de colibacilles de diverses origines pour se rendre compte de la constance de la réaction et de sa valeur pratique.

Ce sont les conclusions de l'auteur que nous rappelons ici :

L'ensemencement de colibacilles de diverses provenances sur le milieu solide préparé selon la technique indiquée plus haut donna les résultats consignés dans le tableau suivant :

	Virage au noir en 24 h.	Virage au noir en 48 h.	Pas de virage
Colibacilles de collection	0	3	1
Colibacille chromogène à pigment vert, Type Lesage (collection)	0	1	0
Colibacilles isolés récemment de matiè- res fécales	2	2	0
Colibacilles provenant de pyélonéphri- tes (Lebeuf)	2	4	1
Colibacilles provenant de pyélonéphri- tes (Banssillon)	0	0	2
Colibacilles provenant d'eaux de la ré- gion lyonnaise	4	9	5
Colibacilles provenant d'eaux de la ré- gion de Nancy (Züher)	2	1	7
Colibacilles provenant de la région de Lausanne (Suisse) (Bornand)	0	2	3
	—	—	—
	10	22	19

Ces résultats montrent que la réaction est en défaut 19 fois sur 51 bacilles étudiés, soit dans la proportion de 37,25 %, un peu plus du tiers des cas.

L'emploi du bouillon à l'esculine (0,5 pour 1000 d'esculine et proportion égale de citrate de fer) ne donna pas des résultats plus favorables. Ensemencé avec les colibacilles précédents, le milieu liquide se montra même inférieur au milieu solide : le virage au noir fut moins énergique et moins net.

Appliqué à la recherche du colibacille dans les eaux, en faisant des dilutions, comme dans les méthodes habituelles de colimétrie et comparativement avec elles, le bouillon esculiné ne parut pas plus efficace. Sur 7 essais, 2 fois la réaction s'est trouvée totalement en défaut, et 2 fois, elle indiqua une quantité faible de colibacilles très inférieure à celle indiquée par les autres.

Pour deux échantillons de lait, rendus artificiellement colibacillaires au moyen de deux échantillons de colibacilles isolés dans ce but de matières fécales, la réaction se montra encore plus inconstante : des deux échantillons, l'un ayant donné un résultat négatif, l'autre ayant donné un virage indiquant une quantité de microbes très inférieure à celle connue d'avance, qui y avait été introduite.

En somme, les milieux à l'esculine ne permettent pas d'obtenir avec le colibacille une réaction suffisamment constante pour constituer un caractère biochimique de réelle valeur.

D'autre part, appliqués à la détection du colibacille dans les eaux et dans le lait, ils ne constituent pas un moyen sûr de le déceler et de le doser. Pour les eaux, leur emploi se montre très inférieur aux méthodes classiques. Pour le lait, ils ne constituent pas le moyen simple, commode et sûr, tant désiré et qui reste encore à trouver.

CHAPITRE IV

Application des milieux à l'esculine au diagnostic différentiel des Bactéries du groupe strepto-entero-pneumocoque.

Nous venons de montrer que les milieux à l'esculine préconisés par HARRISON et VAN DER LECK pour la diagnose du colibacille et sa recherche dans les eaux sont infidèles, un grand nombre d'échantillons de ce microbe ne produisant pas le virage au noir du milieu. Par contre, ainsi que l'a montré ROCHAIX, en 1924, ce milieu paraît pouvoir servir à la différenciation des individus du groupe strepto-entero-pneumocoque.

On sait combien les microbes de ce groupe ont d'étroites ressemblances. On rencontre souvent dans la pratique bactériologique des intermédiaires pour le classement desquels on éprouve de réelles difficultés. Aussi n'est-il pas inutile d'ajouter un moyen nouveau de diagnostic différentiel à ceux qui sont déjà connus.

Le milieu employé a été l'agar à l'esculine proposé

par les auteurs précités sous le nom d' « Aesculin-Bile-Salt » (esculine + citrate de fer + sels biliaires).

Sur ce milieu, nous avons ensemencé 24 échantillons d'entérocoques de diverses provenances. Tous ces échantillons nous ont donné en 24 heures la coloration noire caractéristique, sauf un seul pour lequel la réaction a été complètement en défaut et un second pour lequel elle a été peu intense.

Les échantillons de pneumocoques ensemencés sur ce milieu n'ont jamais poussé.

Quant aux streptocoques, ils donnent des colonies en grains de semoule, identiques à celles que l'on obtient sur l'agar ordinaire, mais on n'observe, en général, aucun changement de coloration du milieu. Quatorze souches différentes de streptocoque hémolytique de diverses origines ont été examinées. Les résultats ont été négatifs pour toutes, même après plusieurs jours d'étuve à 37°.

En ce qui concerne le *streptococcus viridans*, le premier échantillon que nous avons étudié a donné très nettement en 24 heures la coloration noire caractéristique. Nous avions espéré alors trouver dans ce milieu un nouveau caractère de différenciation entre le streptocoque hémolytique et le *streptococcus viridans*, mais le fait ne s'est pas confirmé et 5 autres souches de *viridans* n'ont pas donné la réaction. Une d'entre elles, cependant, a produit une légère coloration tirant sur le noir au bout de 48 heures, mais la réaction n'était pas nette.

Enfin, un streptocoque à la fois hémolytique et *viridans* et un streptocoque non hémolytique et non *viridans*, provenant d'une infection puerpérale, nous ont donné des résultats entièrement négatifs.

Sur 22 streptocoques, un seul a donné une réaction positive.

En somme, on peut dire que, d'une façon générale, l'entérocoque pousse sur ce milieu et le noircit ; le streptocoque pousse mais ne le noircit pas. Le pneumocoque ne s'y développe pas. L'agar à l'esculine peut donc aider à la différenciation des trois principaux microbes du groupe, strepto-entéro-pneumocoque . Le fait a été d'ailleurs confirmé par P. MOLLIEUX, A. DUFOUT, etc.

CHAPITRE V

Application des milieux à l'esculine au diagnostic différentiel du *Proteus* X19.

Poursuivant notre étude sur l'utilité de l'esculine en bactériologie, nous remarquâmes que deux bacilles très voisins : le *Proteus Vulgaris* de HAUSER et le *Proteus* X19, réagissaient de façon fort différente sur les milieux à l'esculine.

Frappé de l'intérêt que présentait cette différenciation d'autant plus curieuse qu'elle s'appliquait à deux microbes appartenant à la même espèce, nous multipliâmes nos expériences en opérant sur le plus grand nombre de germes possibles et nous obtînmes constamment des résultats analogues.

Cette intéressante distinction — confirmée du reste par la réaction d'agglutination de WEIL-FÉLIX — nous incita à penser que le *Proteus* X19 constituait une variété sinon une espèce différente du *Proteus Vulgaris*. Nous cherchâmes donc s'il était possible d'observer d'autres caractères biochimiques particuliers dans l'étude comparée de l'action protéolytique et saccharolytique de ces deux éléments microbiens.

C'est le résultat de ces recherches que nous exposons dans ce chapitre.

A) Différenciation du « Protéus XI9 » et du « Protéus Vulgaris » par la réaction d'agglutination de Weil-Félix.

En 1915, WEIL et FÉLIX isolèrent de l'urine d'un malade atteint de typhus exanthématique une variété de *Proteus*, qu'ils désignèrent sous le nom de *Proteus* XI9, semblable en tous points au « bacille de HAUSER », mais doué de la propriété extrêmement curieuse de se laisser agglutiner à un taux élevé par le sérum des typhiques. Ce germe, retrouvé plusieurs fois par ces auteurs au cours de leurs recherches, présenta toujours les mêmes caractères morphologiques et biochimiques que le *Proteus Vulgaris*, mais s'en distingua constamment par ses propriétés spéciales d'agglutinabilité.

Depuis cette importante découverte, et en l'absence de tout autre élément de différenciation, la réaction de WEIL-FÉLIX permet seule jusqu'ici d'établir le diagnostic différentiel de ces deux éléments microbiens.

a) *Technique de la réaction d'agglutination de Weil-Félix :*

Pour procéder à l'examen de nos souches au point de vue de leur agglutinabilité, nous avons utilisé le procédé macroscopique de la façon suivante : (1)

(1) Nous remercions le Docteur Henry (de Constantine) qui nous a fait profiter de son expérience particulière de la réaction de WEIL-FÉLIX.

1°- Emulsionner dans deux centimètres cubes d'eau physiologique une culture de *Proteus* sur gélose, âgée de 18 à 20 heures. Cette préparation constitue le point le plus délicat de la réaction. Il faut avoir soin de faire une émulsion extrêmement claire — on ne doit pouvoir apprécier le trouble du liquide qu'en le comparant avec la teinte que présente l'eau physiologique placée dans un tube témoin ; une émulsion trop épaisse empêche souvent l'agglutination de se produire, et laisse croire à un résultat que l'on considère à tort comme négatif.

2°- Dans une série de tubes à agglutination, verser respectivement XVIII gouttes, XXVII gouttes, XXXVIII gouttes d'émulsion microbienne.

3°- Dans le premier tube faire tomber II gouttes de sérum de typhique, dans le deuxième III gouttes du liquide (émulsion et sérum) contenu dans le premier tube ; dans le troisième II gouttes du liquide du premier tube. Agiter rapidement pour obtenir le mélange. On obtient ainsi trois dilutions, au dixième, au centième, au deux-centième. Ce nombre de dilutions est suffisant dans la pratique courante ; il est d'ailleurs aisé de pousser plus loin le titrage si l'on veut déterminer le taux limite d'agglutination.

4°- Porter les tubes à l'étuve à 37°5, pendant 8 à 10 heures, puis les abandonner pendant 12 à 14 heures à la température du laboratoire, en ayant soin de les observer de temps à autre. Si l'on ne dispose que d'un sérum vieilli ou agglutinant à un taux faible, il faut prolonger le séjour des tubes à l'étuve pendant 16 à 18 heures, et les laisser encore 8 à 10 heures à la température du laboratoire.

L'agglutination se produit d'une façon plus ou moins rapide suivant les souches. Si elle est rapide (4 ou 5 heures), les grumeaux formés sont volumineux et apparaissent nettement après légère agitation. Si elle est tardive, les granulations sont plus fines, et méritent pour être décelées un examen plus attentif.

En cas de réaction négative, aucune floculation n'apparaît, le liquide reste uniformément trouble.

L'examen ne peut-être dit « positif » que si l'agglutination se produit au moins à 1 pour 100 ; au-dessous de ce taux, il n'a aucune valeur.

b) Résultats.

Nos recherches ont été effectuées sur une dizaine de souches de *Proteus Vulgaris* provenant de selles de nouveau-né, de viandes putréfiées, d'urine, d'eaux d'égout, de matières fécales, de divers laboratoires, sur cinq souches différentes de *Proteus* X19 — « Metz », « Syrie », « Sacquépée », « *Cocobacillus Byzantinensis* », « IP d'Alger » — et enfin sur une souche « *P* » isolée par nous personnellement d'un foie de cobaye en putréfaction.

Nos tubes à agglutination ont été mis à l'étuve à 37°5 pendant 10 heures, puis, après examen, laissés pendant 14 heures à la température du laboratoire. Dans tous les cas, le deuxième examen ne fit que confirmer (plus nettement peut-être) le premier qui nous donna les résultats suivants :

Quatre souches de *Proteus* X19 — « Metz », « Sacquépée », « *Cocobacillus Byzantinensis* », « IP d'Alger » — furent agglutinées par le sérum de typhique à une

dilution de 1/200°. La souche « Syrie » fut agglutinée nettement à 1/100°.

Tous nos échantillons de *Proteus Vulgaris* nous donnèrent une réaction négative. Si quelques-uns d'entre eux furent agglutinés par le sérum à une dilution à 1/10, aucun ne nous fournit un résultat positif à une dilution plus forte.

Par contre, nous fûmes dans l'impossibilité d'interpréter la réaction que nous obtînmes avec la souche « P ». A une dilution faible (1/10), l'agglutination resta franchement négative, mais à un taux plus élevé (1/100° et 1/200°) le liquide ne présenta ni le trouble uniforme observé dans les différentes cultures de *Proteus Vulgaris*, ni les amas plus ou moins fins donnés par les divers échantillons de *Proteus* X19. La petite quantité de sérum que nous avions à notre disposition ne nous permit malheureusement pas de renouveler l'expérience et d'obtenir une certitude à ce sujet. Et le fait est d'autant plus regrettable que ce germe se montra assez différent du « Bacille de Hauser » et se rapprocha plutôt du *Proteus* X19 par ses caractères biochimiques.

c) Valeur de la réaction de Weil-Félix.

La réaction de Weil-Félix permet-elle de différencier avec certitude le *Proteus* X19 du *Proteus Vulgaris* ?

Le *Proteus* X19 n'est pas considéré actuellement comme l'agent déterminant du typhus exanthématique.

Mais, comme on le sait, d'après les recherches faites dans l'armée allemande par DIETRICH ayant porté sur 500 cas de typhus et presque autant de témoins, il ressort que le microbe de WEIL-FÉLIX est agglutiné dans 90 pour 100 des cas de typhus à 1/100° et au-delà, tandis que les

non typhiques ou ne l'agglutinent pas ou l'agglutinent à un 1/50° tout au plus.

W. J. WILSON, dans une publication parue en Juin 1917, admet le même pourcentage de cas positifs.

SUHATEANU qui a observé de nombreux cas de typhus en Roumanie a noté 96,5 pour 100 de cas positifs ; la réaction est donc négative dans 3,5 pour 100 des cas (communication inédite).

WOLBACH, TODD, PALFREY signalent des résultats négatifs (à 1/100°) dans 3 pour 100 des cas, positifs dans le reste des cas à des dilutions souvent très élevées.

Il semble donc que la réaction d'agglutination soit le meilleur moyen que nous ayons actuellement à notre disposition pour la différenciation du *Proteus* X19, et du *Proteus Vulgaris*.

B) Différenciation du « *Proteus* X19 » et du « *Proteus Vulgaris* » par leur action protéolytique.

Pour chercher un nouvel élément de différenciation, nous avons procédé à l'étude de leur action protéolytique respective. Nos recherches ont été effectuées sur six souches de *Proteus* X19 et sur 13 souches de *Proteus Vulgaris* de provenances diverses ; le nom et l'origine de chacun des bacilles qui a servi à nos expériences sont indiqués dans un tableau placé à la fin du chapitre.

Afin de mesurer le degré de leur action protéolytique nous avonsensemencé toutes ces cultures sur gélatine, sur sérum coagulé et sur cube de blanc d'œuf.

a) sur gélatine :

Ensemencées en piqure sur ce milieu, nos souches

se comportèrent d'une façon à peu près identique. La plupart d'entre elles attaquèrent la gélatine au bout de 48 heures de séjour à la température du laboratoire (16°) et en achevèrent la liquéfaction au bout de dix à douze jours. Cependant deux échantillons de *Proteus* X19 (« IP d'Alger » et *Cocobacillus Byzantiensis*) et deux de *Proteus Vulgaris* provenant de Lausanne (« 13 L » et « 3 L » ne provoquèrent aucune liquéfaction, même après un séjour assez prolongé à la température du laboratoire.

Le fait nous paraissait digne de retenir l'attention d'autant plus que la liquéfaction du milieu gélatiné a toujours été considérée comme un signe de différenciation extrêmement important de ce groupe microbien.

Certains d'avoir entre nos mains des souches très pures de *Proteus*, nous cherchâmes à leur rendre ce pouvoir protéolytique et pratiquâmes dans ce but des ensemencements successifs sur gélatine en boîtes de PETRI. L'étalement se fit en promenant l'anse de platine sur la surface du milieu.

La souche « 3 L » présenta rapidement un aspect caractéristique : autour des points ensemencés formant des centres blanchâtres se développèrent des prolongements radiés de forme variable ; puis le septième jour dans un de ces prolongements, apparurent quelques éléments liquéfiant qui furent prélevés et repiqués dans l'eau de condensation d'un tube de gélose inclinée. Après 24 heures de séjour à l'étuve, nous fîmes l'isolement de la culture à la surface supérieure de la gélose : et l'échantillon parfaitement pur ainsi prélevé, eut la propriété d'attaquer la gélatine au bout de 48 heures.

Les souches « 13 L » et « IP d'Alger » ne reprirent que plus lentement leur pouvoir protéolytique. Ensemencées

en boîtes de PETRI, elles se développèrent à peu près comme la précédente, mais au bout de 10 jours, aucun point de liquéfaction n'était encore apparu. Cependant, certains éléments qui paraissaient ramollir le milieu furent prélevés et étalés de nouveau sur la gélatine ; après cinq jours, il était possible d'isoler quelques colonies liquéfiantes.

Enfin, malgré des passages réitérés sur gélatine, nous ne pûmes faire retrouver au « *Cocobacillus Byzantinensis* » sa propriété protéolytique. Nous croyons cependant la chose possible ; mais la technique est excessivement délicate par suite du séjour prolongé des cultures en boîtes de PETRI, et des contaminations très fréquentes qui s'y produisent.

Comment expliquer la disparition de ce pouvoir protéolytique ? D'après les observations faites, il nous semble que le vieillissement des cultures sur gélose diminue sensiblement et peut même faire disparaître cette propriété : les deux souches de *Proteus Vulgaris* ayant perdu toute action sur la gélatine, nous provenaient du Laboratoire de Lausanne où elles étaient repiquées sur gélose depuis plus d'une dizaine d'années. Cette disparition n'est le plus souvent que temporaire, puisqu'il est possible de faire retrouver aux vieilles cultures leur activité primitive par un nouvel entraînement sur un milieu riche en matières albuminoïdes.

Les souches récemment isolées, et spécialement celles qui proviennent de substances animales putréfiées, possèdent un pouvoir protéolytique particulièrement intense. Aussi, dans l'isolement et la détection des *Proteus*, doit-on considérer comme un signe de différenciation

extrêmement important leur action liquéfiante sur les milieux gélatinés.

Quant à trouver dans ce moyen un élément de diagnostic différentiel entre les deux catégories de germes, les résultats que nous avons obtenus ne nous autorisent pas à le penser : à une observation attentive, il semble bien que l'activité du *Proteus* X19 se manifeste un peu plus lentement que celle du « Bacille de Hauser », mais cette distinction est vraiment trop discrète pour qu'il soit permis d'en tenir compte.

b) *Sur sérum coagulé :*

Si l'ensemencement de nos différentes souches de *Proteus* sur sérum coagulé ne nous donna pas davantage de certitude à cet égard, il nous permit du moins de confirmer les résultats obtenus avec les milieux gélatinés.

Les souches récemment isolées, notamment « A », « F » et « X » manifestèrent leur action protéolytique avec une activité particulièrement intense. En une dizaine de jours, la liquéfaction du sérum était devenue complète.

La plupart des autres échantillons attaquèrent le milieu au bout de 48 heures de séjour à l'étuve et en complétèrent la liquéfaction en une vingtaine de jours.

Considérées dans leur ensemble, les souches de *Proteus* X19 nous parurent un peu moins actives ; mais là encore les différences observées ne furent pas suffisamment nettes pour constituer un signe différentiel de grande valeur.

Quant aux souches « 13 L » et « 3 L » (*Proteus Vulgaris*), « I. P. d'Alger » et « *Cocoba-*

cillus Byzantinensis » (*Proteus* X19), elles n'attaquèrent pas davantage le sérum coagulé, qu'elles n'avaient attaqué la gélatine, même après un séjour de plusieurs semaines à la température de 37°,5. Il est inutile d'ajouter que ces expériences furent faites avec les souches primitives et non avec celles que nous obtînmes ultérieurement après passages successifs en milieu gélatiné. Ces dernières ne furent pasensemencées sur sérum coagulé, mais il n'est pas douteux qu'elles en eussent provoqué la liquéfaction, comme les autres échantillons, à l'exception toutefois du « *Cocobacillus Byzantinensis* » auquel nous ne pûmes rendre son pouvoir protéolytique.

c) *Sur cubes de blanc d'œuf :*

La dissociation de ce milieu albumineux se montra lente et irrégulière.

Dans un tube contenant du bouillon peptoné (10 cm³) on plaça un cube de blanc d'œuf cuit dur, de la grosseur d'une noisette. La stérilisation effectuée à l'autoclave, on fit l'ensemencement en ajoutant au milieu un demi-centimètre cube environ de la culture microbienne en eau peptonée, âgée de 24 heures

Ainsi préparés, les tubes furent mis à l'étuve et examinés chaque semaine. Au bout de soixante jours, les résultats furent notés.

Les trois souches de « *Vulgaris* » isolées d'eaux d'égout « A », « F », « X » désagrègent à peu près complètement le cube de blanc d'œuf. Les échantillons de la même espèce « I », « R », « 18 L » « U », « Berne », l'attaquent encore de manière sensible.

L'action des souches « M », « V », « T » et des *Proteus* X19, « Metz », « Syrie », « P » et « Sacquépée » reste extrêmement discrète. Enfin les échantillons « IP d'Alger » et « *Cocobacillus Byzantinensis* », « 3 L » et « 13 L » qui n'ont montré aucune activité sur gélatine et sur sérum coagulé, laissent absolument intact ce nouveau milieu albumineux.

La lecture de ces résultats nous autorise à dire que, d'une manière générale, les souches de *Proteus* X19 agissent à peine sur cubes de blanc d'œuf, tandis que la plupart de nos échantillons de « Bacille de Hauser » attaquent ce milieu de façon assez nette.

L'exposé des faits précédents nous permet donc de conclure que l'action protéolytique du « Microbe de Weil-Félix » est moins grande que celle du « *Proteus Vulgaris* ». Si cette action se montre avec une activité à peu près égale sur gélatine et sur sérum coagulé, elle est moins rapide et moins intense sur cubes de blanc d'œuf. Mais les différences observées n'ont pas un caractère suffisamment absolu pour fournir un élément de certitude dans la diagnose de ces deux catégories de germes.

C) Differentiation du « *Proteus* X19 » et du « *Proteus Vulgaris* » par leur action saccharolytique.

L'action saccharolytique de ces deux éléments microbiens permet-elle de les différencier d'une manière plus précise ?

Les auteurs qui ont étudié les propriétés saccharoly-

tiques du groupe « *Proteus* » ont obtenu des résultats très différents les uns des autres.

Les uns, comme LEIBORIUS, GAILLARD, THEOBALD SMITH, HERTER et TEN BROECK, BERTHELOT, sont d'accord pour affirmer que ce microbe, quelle que soit son origine, attaque toujours le glucose et le saccharose, mais laisse intact le lactose, tandis que d'autres, comme Ch. CANTU, prétendent que « les sucres sont attaqués par tous les *Proteus* ; avec le lactose seulement, l'attaque n'est pas constante avec toutes les races et avec un même *Proteus* ».

BERTHELOT signale encore la fermentation constante du galactose et la non-fermentation de la mannite. Quant au maltose et au lévulose, ils se comportent de façon variable selon les souches.

Dans une étude portant sur une vingtaine d'échantillons de *Proteus Vulgaris* isolés de matières fécales au cours d'une épidémie dysentérique, Aimée HOROWITZ arrive à des conclusions un peu différentes : si le *Proteus* reste sans action sur le lactose, il attaque toujours le glucose et la mannite, et quelquefois le maltose et le saccharose.

Nous devons signaler enfin les travaux récents de BESSON et EHRINGER. Ces auteurs, qui s'appliquèrent à déterminer d'une façon très précise les caractères distinctifs de cette espèce microbienne, affirment que le *Proteus Vulgaris* ne fermente jamais le lactose, la mannite et la dulcité, fermente toujours le glucose, le lévulose et la glycérine, et quelquefois aussi le maltose, le saccharose et le galactose (selon les souches).

Il est assez difficile de se faire une idée de la valeur respective des conclusions de ces divers expérimentateurs, car elles résultent de recherches faites dans des conditions par trop dissemblables. C'est ainsi que GAILLARD et HERTER ont étudié un très petit nombre de races, tandis que Ch. CANTU a examiné près de 200 *Proteus* d'origines extrêmement variées. D'autre part, les auteurs, que nous venons de citer, ne précisent guère, dans leurs mémoires, la composition des milieux qu'ils ont utilisés et ne donnent que fort peu de détails sur la technique qu'ils ont suivie. A. BERTHELOT, toutefois, qui examina l'action de 61 échantillons de « Bacille de Hauser » sur sept substances hydrocarbonées, indique la constitution de ses milieux de cultures, et la méthode de recherche qu'il appliqua pour cette étude.

Devant la diversité des résultats obtenus jusqu'ici, nous avons tenu, à notre tour, à étudier l'action des *Proteus* sur un grand nombre d'hydrates de carbone, non seulement dans le but de préciser quelque peu la valeur d'un caractère important, mais encore et surtout pour tâcher d'y découvrir un élément de différenciation entre le « *Vulgaris* » et l'« *X19* ».

a) *Recherches personnelles:*

Nos recherches ont été effectuées sur six souches de *Proteus* X19 et treize souches de *Proteus Vulgaris* d'origines extrêmement variées.

Pour l'examen de toutes ces races, nous nous en som-

mes tenus à une méthode de recherche simple et d'application rapide, en nous efforçant toutefois d'éviter les causes d'erreur dont certains expérimentateurs ne semblent pas s'être inquiétés. Dans tous nos essais, nous n'avons utilisé que des procédés purement qualificatifs. Il eut été, certes, intéressant de déterminer quantitativement les propriétés biochimiques de chacun des échantillons de *Proteus*. Nous n'avons pu entreprendre cette étude qui dépassait le modeste cadre de ce travail. Cette analyse, du reste, n'aurait pas eu, pour nous, un grand intérêt pratique, le but que nous nous proposons avant tout étant de trouver une réaction simple et commode qui permette d'établir rapidement le diagnostic différentiel entre le *Proteus* X19 et le « Bacille de Hauser ».

Nous avons étudié l'action de ces agents microbiens sur les hydrates de carbone suivants :

glucose, lactose, saccharose, maltose, mannite, lévulose, galactose, glycérine, amidon, inuline, inosite, arabinose, sorbite, lactosite, dulcité, glycogène, xylose, adonite, aloïne, amygdaline, phlorydzine, salicine, esculine, arbutine. L'étude de ces trois derniers hydrates fera l'objet du paragraphe suivant :

Préparation des milieux sucrés :

Pour 1000 grammes d'eau, ajouter :

Peptone (Chapoteaut)	30 grammes
Sel marin	10 grammes

Faire dissoudre à feu doux en agitant. Porter à l'ébul-

lition. Alcaliniser légèrement par la soude. Puis stériliser à 120°, pendant une demi-heure.

Faire réduire par ébullition à 100 centimètres cubes, 150 cm³ de teinture alcoolique de tournesol (GIVAUDAN-LAVIROTTE) quantité nécessaire pour un litre d'eau peptonée.

Le sucre, pesé aussi aseptiquement que possible et laissé en contact de l'éther sulfurique à 65°, pendant plusieurs heures, est alors additionné au milieu de culture à la dose de 1 pour 100.

Ainsi préparé, souvent ce milieu rougit ou reste sans coloration. Alcaliniser alors avec une solution de soude jusqu'à l'obtention d'une belle teinte améthyste. Cette manipulation est particulièrement délicate et nécessite une technique très sûre : tous les milieux sucrés doivent présenter une coloration uniforme.

Pour nous placer dans des conditions d'expérimentation identiques, dans toutes nos recherches, nous avons employé la même teinture alcoolique de tournesol (GIVAUDAN LAVIROTTE). A l'exception des milieux à l'aloïne et à la phlorydzine, cet indicateur nous donna, du reste, toute satisfaction.

Les milieux ainsi obtenus sont filtrés par pression sur bougie Chamberland F et recueillis dans les flacons de Wolff à deux tubulures latérales. La répartition en tubes se fait aseptiquement peu de temps avant l'utilisation. Ce mode de stérilisation présente l'avantage de s'opérer à froid et de ne pas modifier la fermentation de la molécule hydrocarbonée, comme semble le faire la chaleur. Quant à l'emploi du flacon de Wolff, il nous



T. 1

T. 2

T. 3

T. 1. — Culture de « *Proteus Vulgaris* » sur gélose esculinée, après 48 heures de séjour à l'étuve.

T. 2. — Culture de « *Proteus X 19* » sur gélose esculinée, après 6 heures de séjour à l'étuve.

T. 3. — Culture de « *Proteus X 19* » sur gélose esculinée, après 24 heures de séjour à l'étuve.

paraît particulièrement utile pour assurer la conservation aseptique du milieu.

Les tubes à essai, contenant l'eau peptonée sucrée (huit centimètres cubes environ), sontensemencés avec un demi-centimètre cube de culture microbienne en eau peptonée âgée de 24 heures, et portés à l'étuve à 37°,5. L'examen a lieu toutes les vingt-quatre heures. Dans les cas de fermentation, le milieu présente rapidement une coloration rouge plus ou moins vive. Dans les cas de non fermentation, il conserve sa teinte primitive. Cependant, sous l'influence réductrice de la culture microbienne, fréquemment, l'eau peptonée se décolore : il suffit alors d'oxygéner le milieu par agitation du tube pour voir apparaître la teinte bleue ou rouge, indicatrice de la réaction.

Comme BERTHELOT signale que certaines races de *Proteus* n'acidifient quelques milieux (notamment les milieux saccharosés) qu'au bout d'une dizaine de jours, nous avons soin, pour éliminer toute cause d'erreur, de conserver nos cultures pendant une quinzaine de jours. Mais cette méthode nous a permis de constater que les fermentations les plus tardives se produisent au bout du cinquième jour et, qu'après un pareil séjour à l'étuve, aucune modification n'est apportée aux milieux.

b) Résultats :

Nos résultats sont présentés dans le tableau suivant :

FERMENTATIONS SUCRÉES

	Glucose	Lactose	Maltose	Saccharose	Lévilose	Galactose	Mannite	Dulcite	Adonite	Sorbite
<i>Proteus X19</i> "Syrie"	+ 1	0	+ 1	+ 1	0	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus X19</i> "Metz"	+ 1	0	+ 1	+ 1	0	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus X19</i> "Saquépée"	+ 1	0	+ 1	+ 1	0	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus</i> "IP d'Alger"	+ 1	0	+ 1	+ 1	0	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus X19</i> "Cocobacillus Byzantineasis"	+ 1	0	+ 1	+ 1	0	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus</i> "P"	+ 1	0	+ 1	+ 1	0	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulgaris</i> "T"	+ 1	0	0	0	+ 2	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulg.</i> "U"	+ 1	0	0	0	0	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulg.</i> "3L"	+ 1	0	+ 1	+ 1	0	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulg.</i> "13L"	+ 1	0	+ 1	+ 1	+ 2	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulg.</i> "18L"	+ 1	0	0	+ 1	+ 2	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulg.</i> "Berne"	+ 1	0	0	0	+ 2	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulg.</i> "R"	+ 1	0	0	0	+ 2	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulg.</i> "I"	+ 1	0	0	0	+ 2	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulg.</i> "V"	+ 1	0	+ 1	+ 1	0	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulg.</i> "M"	+ 1	0	0	0	0	+ 1	0	0	0	0
<i>Proteus Vulg.</i> "A"	+ 1	0	0	0	+ 1	+ 1	0			
<i>Proteus Vulg.</i> "F"	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	0	+ 1	0			
<i>Proteus Vulg.</i> "X"	+ 1	0	0	0	+ 1	+ 1	0			

+ indique un résultat *positif* et le chiffre qui suit le signe indique l'intensité de la fermentation.

0 indique un résultat *négatif*.

FERMENTATIONS SUCRÉES

<i>Inuline</i>	<i>Glycérine</i>	<i>Amidon</i>	<i>Glycogène</i>	<i>Arabinose</i>	<i>Xylose</i>	<i>Inosite</i>	<i>Alaine</i>	<i>Phlorydine</i>	<i>Lactosite</i>	<i>Amygdaline</i>	<i>Salicine</i>	<i>Arbutine</i>	<i>Esculine</i>
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	+ 1	+ 1	+ 1
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	+ 1	+ 1	+ 1
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	+ 1	+ 1	+ 1
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	+ 1	+ 1	+ 1
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	+ 1	+ 1	+ 1
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	+ 1	+ 1	+ 1
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	0	0	0
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	0	0	0
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	0	0	0
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	0	0	0
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	0	0	0
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	0	0	0
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	0	0	0
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	0	0	0
0	+ 3	0	0	0	+ 1	0			0	0	0	0	0
0	+ 1	0	0	0	+ 1	0			0	0	0	0	0
0	+ 2								0	0	0	0	0
0	+ 2								0	0	0	0	0
0	+ 2								0	0	0	0	0

indique le nombre de jours d'étuve à 37°,5 nécessaire pour cons-

Malgré la variabilité des résultats obtenus, la lecture de ce tableau nous suggère quelques observations intéressantes.

Tous les échantillons de *Proteus* ont fait fermenter d'une façon constante le glucose, le galactose, la glycérine et le xylose. Pour ce dernier sucre, il est nécessaire d'employer une eau peptonée xylosée tournesolée aussi fraîche que possible.

Aucune souche ne fait fermenter la mannite, l'adonite, la dulcité, la sorbite, l'inuline, l'amidon, le glycogène, l'arabinose, le lactosite, l'inosite, l'amygdaline et le lactose.

Toutefois, un de nos bacilles « F » isolé d'eaux d'égout attaqua nettement cette dernière substance au bout de 24 heures de séjour à l'étuve. Comme tous les expérimentateurs à peu près, sauf Ch. CANTU, s'accordent à reconnaître que le lactose n'est jamais attaqué par cet agent microbien, nous avons tenu à vérifier ce résultat en éliminant toutes les causes d'erreur qui auraient pu se glisser dans la technique suivie.

Nous acquiescimes d'abord la certitude qu'il s'agissait bien d'un « *Proteus Vulgaris* » et non d'une bactérie voisine : les caractères morphologiques et biologiques présentés par le bacille « F », furent en tous points comparables à ceux d'autres microbes de même race, isolés dans des conditions identiques.

D'autre part, comme dans certains cas exceptionnels, les microbes récemment isolés peuvent présenter des caractères atypiques qui disparaissent ultérieurement, nous avons eu soin de cultiver la souche « F » pendant plusieurs mois sur les milieux usuels de laboratoire, et

de la repiquer très fréquemment. Malgré cette précaution, elle conserva, à chacun de nos examens, la propriété de produire, en 24 heures, une acidification nette de l'eau peptonée lactosée. Signalons que deux autres échantillons, isolés d'eaux d'égout à peu près vers la même époque, n'apportèrent jamais aucune modification au milieu lactosé.

Aucune souche de *Proteus* X19 n'a fait fermenter le lévulose, alors que huit souches sur treize de *Proteus Vulgaris* en ont provoqué la fermentation en 48 heures.

Les six échantillons de *Proteus* X19 ont fait fermenter le maltose ; quatre seulement de « Bacille de Hauser » l'ont fait fermenter.

Dans l'ensemble de ses actions fermentatives, le *Proteus Vulgaris* s'est avant tout montré comme un puissant réducteur. Au bout de quelques heures de séjour à l'étuve, les milieux ensemencés avaient perdu toute coloration, et il était nécessaire de les oxygéner par agitation pour leur redonner la teinte bleue ou rouge. Le *Proteus* X19, au contraire, ne décolore pas l'eau peptonée tournesolée, qui reste bleue dans les cas de non fermentation et rouge dans les cas de fermentation.

On remarquera que dans le tableau des réactions sucrées nous ne donnons aucun résultat en ce qui concerne l'aloïne et la phlorydzine. Cette lacune provient du fait que ces deux hydrates de carbone sont attaqués par la teinture de tournesol.

c) Discussion des résultats:

Les résultats de nos recherches personnelles confir-

ment, pour le glucose seul, les constatations des auteurs qui ont étudié l'action saccharolytique du *Proteus*.

Si, dans la majorité des cas, le lactose ne se trouve pas attaqué par cet agent microbien, il n'en reste pas moins vrai qu'une de nos souches a provoqué la fermentation énergique de cette substance hydrocarbonée. Nos souches ne nous ont pas donné la fermentation constante du saccharose qu'avait obtenue BERTHELOT avec les souches utilisées par lui.

La mannite a toujours donné un résultat négatif, alors qu'Aimée HOROWITZ assure que la fermentation de ce sucre est constante.

Contrairement aux assertions de BESSON, le lévulose n'a été fermenté que par certaines souches, alors que toutes ont attaqué le galactose d'une manière très énergique en 24 heures.

A quelle cause attribuer des conclusions aussi dissemblables ?

La variabilité des résultats nous parait due en partie à la constitution des milieux de culture utilisés et à la technique suivie. Il ne nous est malheureusement pas possible d'apporter des précisions à ce sujet, les auteurs qui ont étudié la question ne nous donnant en général, aucune indication sur leurs procédés de recherche.

Signalons toutefois, que le bouillon de viande, fréquemment employé, est susceptible de modifier les actions fermentatives, puisqu'il contient une certaine quantité de sucre dont on ne peut tenir compte dans des recherches purement qualitatives.

D'autre part, la stérilisation des milieux de culture

par la chaleur à 120 degrés, telle qu'elle est employée habituellement dans un grand nombre de laboratoires, au lieu de la filtration que nous avons utilisée est peut-être suffisante pour troubler la nature des réactions étudiées.

Mais ce n'est pas là l'unique cause de tant de divergences ?

Malgré les éclaircissements récemment apportés par BESSON et EHRLINGER, éclaircissements qui ont permis de mettre un peu d'ordre dans un groupe qui jusqu'alors abritait les germes les plus disparates, le genre « *Proteus* » reste assez mal connu, sinon dans ses caractères essentiels, du moins dans ses modifications à l'égard des substances hydrocarbonées.

Envisagée au point de vue purement qualitatif, l'action saccharolytique du « Bacille de Hauser » se montre assez variable suivant les souches. Si quelques hydrates de carbone se comportent d'une façon constamment uniforme vis à vis de toutes les cultures, il n'en va pas de même du saccharose, du maltose, du lévulose, et exceptionnellement du lactose, qui sont attaqués par certains échantillons et respectés par d'autres. Nous n'avons pas recherché si des passages répétés ou certaines influences à déterminer n'auraient pas eu pour effet de rendre ces différences transitoires, comme cela a été observé pour les diverses variétés de bacilles dysentériques attaquant la mannite ; mais les expériences effectuées par VALLE-MIRANDA, sur un très petit nombre de souches, il est vrai, ne semblent pas le laisser espérer.

La diversité des résultats obtenus à cet égard tient vraisemblablement à des différences d'intensité de l'ac-

tion saccharolytique des diverses races, différences qu'il est pratiquement impossible de mettre en évidence à l'aide de procédés purement qualitatifs. Cette hypothèse paraît du reste confirmée par les bactériologistes qui ont étudié le pouvoir fermentatif de ces microbes par des déterminations quantitatives. Nous ne retiendrons ici que les résultats de l'auteur que nous venons de citer, résultats qui revêtent pour nous un intérêt tout particulier du fait qu'ils portent sur deux races de *Proteus Vulgaris* — étiquettées « M » et « V » — que nous avons pu personnellement étudier. Le *Proteus* « M » a été isolé en 1911 par M. METCHNIKOFF dans les matières fécales d'un nourrisson atteint de gastro-entérite aiguë et ayant succombé en quelques jours à cette affection. Quant à l'autre, il a été isolé par l'auteur, d'un fragment de viande de boucherie abandonné pendant quelques jours à la putréfaction à la température ambiante.

Après de minutieuses expériences effectuées suivant une technique très précise, VALLE-MIRANDA arrive aux conclusions suivantes :

« Seul, le *Proteus* « M » rend acides les milieux contenant du lévulose, tandis que les analyses quantitatives montrent que ce sucre est attaqué par les deux microbes. Les cultures en eau peptonée maltosée ne deviennent acides qu'avec le *Proteus* « V » ; les dosages ont tout d'abord confirmé ce résultat qui s'est trouvé infirmé par les analyses des cultures du *Proteus* « M » modifié par des passages. Enfin le lactose, qui qualitativement semble inattaqué par les deux races, est pourtant consommé par elles en petite quantité, ainsi que l'ont établi les dé-

terminations pondérales ». Le saccharose, en outre, a subi l'attaque des deux germes.

Si nous comparons ces résultats avec ceux que nous avons obtenus au moyen des procédés antérieurement décrits, nous constatons qu'ils ne sont pas en parfaite concordance. Nos recherches nous ont en effet montré que les deux échantillons restent sans action sur le lactose et le lévulose, mais que le *Proteus* « V » produit la fermentation du maltose et du saccharose, tandis que le *Proteus* « M » ne fermente aucun de ces deux sucres.

La conservation et le repiquage de ces deux souches pendant une dizaine d'années sur les milieux usuels de laboratoire semblent avoir modifié qualitativement quelques-uns de leurs caractères biochimiques, puisque le *Proteus* « M » a perdu le pouvoir d'acidifier l'eau peptonée lévulosée et saccharosée, alors que le *Proteus* « V » a conservé ses anciennes propriétés fermentatives.

D'autre part, les déterminations pondérales effectuées n'ont pas confirmé entièrement les résultats obtenus par des procédés purement qualitatifs. Les dosages ont permis de se rendre compte que les deux races fermentaient les quatre substances hydrocarbonées, tandis que l'analyse qualitative n'avait pas décelé la fermentation du maltose par le *Proteus* « M », celle du lévulose par le *Proteus* « V » et enfin celle du lactose pour les deux variétés.

Cet exemple, quoique ne concernant qu'un nombre trop limité de souches pour avoir une valeur absolue, nous permet les remarques suivantes :

Sous l'action de certaines influences parfois minimales, les propriétés biochimiques des générations successives

d'une même race de *Proteus* sont susceptibles de changements notables.

Quantitativement, toutes les substances hydrocarbonées couramment employées dans les laboratoires semblent attaquées par le *Proteus* ; qualitativement, certaines d'entre elles paraissent respectées. Seules, les fermentations complètes ou élevées sont décélées par les procédés purement qualitatifs. Pour mettre en évidence une fermentation faible (comme celle du lactose, qui n'est consommé que dans les proportions de 5 % environ), les dosages sont absolument indispensables.

Ces faits montrent combien il faut être prudent dans l'interprétation des résultats obtenus avec une simple étude analytique. Mais, ainsi que nous en avons fait la remarque, dans les applications courantes de la bactériologie à la clinique, l'emploi des dosages pour la diagnose rapide des espèces est irréalisable. Il faut se contenter d'une méthode simple et commode ; et nous pensons que, malgré son infériorité, cette dernière est susceptible de permettre, dans bien des cas, d'établir un diagnostic différentiel précis entre deux bactéries voisines.

Les différences observées dans l'attaque des sucres justifient-elles la distinction de races dans le genre « *Bacille de Hauser* » ?

Considérés dans leurs modes d'action sur le maltose et le saccharose, ces microbes paraissent se diviser en deux variétés : l'une produisant la fermentation de ces substances hydrocarbonées — *Proteus* « 3 L », « 13 L », « F », « V » — ; l'autre ne manifestant aucune activité à

leur égard — *Proteus* « T », « U », « Berne », « R », « T », « I », « M », « A », « X ». Seule la souche « I8 L » se sépare des autres à ce point de vue, déterminant l'acidification du saccharose, sans attaquer le maltose. Mais avec un bacille comme celui qui nous occupe, il serait imprudent de conclure d'une façon catégorique, à l'existence de ces deux sortes de races. La variabilité de cette espèce microbienne, ainsi que les faits que nous venons de rapporter, nous imposent de ne pas attribuer une valeur intrinsèque aux essais basés seulement sur l'observation des réactions finales. Une expérimentation plus étendue semblerait utile.

Peut-on trouver, dans la façon dont se comporte le *Proteus* X19 et le *Proteus Vulgaris* vis à vis des fermentations sucrées, un élément de diagnostic différentiel entre ces deux catégories de germes ? Ainsi que nous l'avons signalé, les eaux peptonées maltosées et saccharosées, sont constamment acidifiées par le microbe de Weil-Félix, alors qu'elles subissent assez rarement l'attaque du « Bacille de Hauser ». En outre, ce dernier fermente fréquemment le lévulose que l'« X19 » laisse toujours intact. Mais ces caractères ne sont pas suffisamment constants pour prendre une réelle valeur.

D'autre part, le *Proteus* X19 ne nous paraît pas soumis aux mêmes variations que le *Vulgaris* vis à vis des fermentations sucrées. Les six variétés d'« X19 » que nous avons pu étudier, nous ont donné des résultats absolument constants avec toutes les substances hydrocarbonées. Aucune n'a produit l'acidification des milieux lactosés et lévulosés; toutes ont attaqué le maltose et le

saccharose. Cette fixité des caractères biochimiques qui ne varient pas avec les diverses races, nous semble un fait important; une expérimentation plus étendue serait indispensable pour en déterminer la valeur.

d) *Conclusions:*

De l'ensemble des recherches que nous venons d'exposer, nous retiendrons les faits suivants:

Les diverses variétés de « Bacille de Hauser » réagissent de manière assez dissemblable sur les milieux sucrés. Cette variabilité, due sans doute à des différences d'intensité de leur action saccharolytique, ne paraît pas exister dans le genre « *Proteus* X19 » dont toutes les races nous ont donné des résultats absolument constants.

Bien qu'il y ait une différence appréciable dans la façon dont se comportent l'« X19 » et le « *Vulgaris* » vis à vis des fermentations sucrées, les caractères que l'on pourrait tirer des différences observées à ce point de vue, ne permettent pas d'établir un diagnostic certain entre ces deux catégories de germes.

D) Différenciation du « *Proteus* X19 » et du « *Proteus Vulgaris* » par leur action sur l'esculine.

Par contre, sur les milieux à l'esculine, ces deux variétés microbiennes donnent des réactions différentes dans tous les cas.

Pour les mettre en évidence, suivant la technique décrite au début de ce travail, nous avons recherché d'une part, la présence du glucose, d'autre part, celle de l'esculétine.

a) *Recherche du glucose:*

Le milieu utilisé a été l'eau peptonée esculinée tournesolée dont nous avons indiqué plus haut la préparation. Dans ce milieu liquide d'une belle teinte bleue fluorescente, nous avonsensemencé un demi-centimètre cube environ d'une culture de *Proteus* en eau peptonée, âgée de 24 heures.

Les résultats ainsi obtenus ont toujours été extrêmement nets.

Après 24 heures de séjour à l'étuve à 37°,5, nos échantillons de *Proteus* X19 ont produit la fermentation du glucose libéré : le milieu a perdu sa fluorescence et pris une coloration rouge vif intense qui a persisté les jours suivants en brunissant légèrement. La souche « P » isolée d'un foie de cobaye en putréfaction nous a donné une réaction absolument identique ; elle s'est du reste rapprochée des « microbes de Weil-Félix » par d'autres caractères biochimiques.

Au contraire, tous nos échantillons de *Proteus Vulgaris* nous ont fourni un résultat négatif ; même après dix jours d'étuve, aucune fermentation n'est apparue au sein du liquide qui a conservé sa teinte bleue primitive. Une semblable réaction implique nécessairement le non-dédoublément de l'esculine par ces agents microbiens,

qui se sont par ailleurs montrés capables, dans tous nos essais, de produire l'acidification constante du glucose.

b) *Recherche de l'esculétine :*

Nous avons procédé à cette recherche suivant la technique précédemment indiquée.

L'eau peptonée citratée esculinée nous a donné des résultats parfois difficiles à interpréter.

Ensemencé avec nos échantillons de *Proteus* X19, le milieu, de teinte légèrement brunâtre, a pris une coloration brune très foncée et parfois franchement noire. A la température de 37°,5, la réaction apparaît au bout de quelques heures ; toutefois, pour les souches « *Cocobacillus Byzantinensis* » et « IP d'Alger », le noircissement resta tellement faible qu'il était difficile de dire, même après comparaison avec un tube témoin, s'il s'agissait d'une réaction positive ou d'une réaction négative.

Ensemencé avec les diverses variétés de *Proteus Vulgaris*, le bouillon esculiné ne subit aucune modification de sa teinte primitive ; mais il était alors nécessaire de faire une lecture précoce, le milieu prenant un aspect plus foncé sous la seule influence d'un séjour un peu prolongé à l'étuve.

A cause des erreurs d'interprétation que peut entraîner l'emploi de ce milieu liquide, nous préférons utiliser le milieu solide préparé d'après les indications d'HARRISON et VAN DER LECK.

Sur l'agar à l'esculine, nous avons ensemencé nos cultures de *Proteus* sur gélose, âgées de 24 heures.

Tous nos échantillons de *Proteus* X19, ainsi que la souche « P », nous ont donné une réaction positive d'aspect typique ; autour de la colonie, elle-même de coloration noirâtre, apparut un cercle brun foncé qui passa rapidement au noir. Puis se développa dans le milieu environnant cette teinte caractéristique. La réaction commença à se manifester après 4 à 5 heures de séjour à l'étuve. Au bout de 18 heures, on obtint un noircissement intense de la gélose. Seules, les souches « IP d'Alger » et « *Cocobacillus Byzantinensis* », à pouvoir fermentatif moindre, ne produisirent la réaction qu'au bout d'une vingtaine d'heures environ. En aucun cas, l'interprétation des résultats ne put porter à confusion.

Par contre, aucune des souches de *Proteus Vulgaris* ne modifia la coloration du milieu, non seulement en vingt-quatre heures, mais même après une dizaine de jours. Parfois, la gélose toute entière présenta une légère teinte brune uniforme qui n'apporta aucune modification à l'aspect normal de la colonie. Ce brunissement, dû sans doute à l'action de l'hydrogène sulfuré formé sur les sels de fer contenus dans le milieu, est totalement différent de la coloration noire intense due au doublement de l'esculine, et à l'action de l'esculétine formée sur les sels de fer.

Oscar KLOTZ et RANKIN sont arrivés à des conclusions analogues. Ils ont obtenu 9 résultats négatifs sur 10 échantillons de *Proteus* d'origines diverses, mais sur lesquels aucune autre précision n'est apportée.

Il eut été intéressant de connaître la nature exacte de

l'unique échantillon qui provoqua le noircissement du glycoside. Sur vingt-quatre échantillons de *Proteus Vulgaris* isolés de matières fécales de malades atteints de dysenterie, Aimée Horowitz n'obtint pas une seule fois une réaction positive.

La concordance des résultats apportés par ces différents auteurs et de ceux que nous avons obtenus personnellement, nous autorise à penser que le « Bacille de Hauser » ne modifie en aucune façon les milieux de l'esculine.

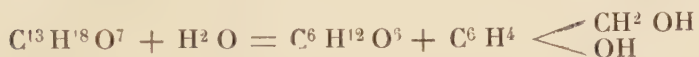
En ce qui concerne les microbes du groupe « Weil-Félix » nous ne pouvons pas apporter une conclusion définitive, nos essais n'ayant porté que sur six souches de diverses provenances. Néanmoins, la constance avec laquelle ces échantillons ont provoqué le dédoublement du glycoside nous permet de croire que les recherches plus étendues, qui pourraient être entreprises, ne viendront que confirmer ces premiers résultats.

Aussi, nous semble-t-il que les milieux à l'esculine soient susceptibles de pouvoir servir à la différenciation des deux variétés microbiennes qui nous occupent.

Les faits précédents paraissent en outre indiquer que le *Proteus* X19 constitue une variété, sinon une espèce, que l'on doit nettement distinguer du *Proteus Vulgaris*. Des recherches plus complètes permettraient peut-être de trouver d'autres éléments de différenciation entre ces deux catégories de germes.

C'est ainsi qu'en poursuivant nos travaux, nous avons été amenés à étudier leur action sur deux autres glycosides, la salicine et l'arbutine.

La salicine, extrait de l'écorce de saule, se dédouble, sous l'influence de certains ferments contenus dans le *Proteus* X19, en glucose et en saligénine (alcool-phénol) :



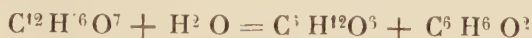
Pour mettre en évidence ce dédoublement, on peut procéder soit à la recherche de la saligénine, soit à celle du glucose libéré dans les cultures.

La présence de l'alcool-phénol ne pouvant être décelée que par des méthodes assez longues et assez complexes, nous nous sommes contentés de rechercher l'élément glucosé.

Le milieu utilisé a été l'eau peptonée salicinée, tournesolée, préparée suivant la technique générale que nous avons indiquée à propos des fermentations sucrées. Comme à l'ordinaire, la stérilisation s'est faite par filtration sur bougie Chamberland F.

En 24 heures, ce milieu a été constamment fermenté (teinte rouge vif) par toutes nos souches de *Proteus* X19, alors que nos échantillons de *Proteus Vulgaris*, de quelle origine qu'il soit, ne l'ont aucunement modifié même au plus léger degré, au bout de plusieurs jours. Là encore, la souche « P » s'est comportée comme les microbes du groupe « Weil-Félix ».

L'arbutine, glycoside hydroquinonique extrait des feuilles de busserole, se dédouble également, sous l'influence d'une culture de *Proteus* X19 en glucose et en hydroquinone (diphénol) :



Au moyen d'une eau peptonée arbutinée tournesolée, il

est facile de mettre en évidence le glucose libéré, qui, par sa fermentation, colore le milieu en rouge vif (la teinte devient rouge brunâtre au bout de deux ou trois jours). La réaction est toujours rapide. En moins de 24 heures, toutes nos souches de *Proteus* X19 ainsi que la souche « P » ont produit une fermentation énergique du liquide, à l'exclusion des échantillons de *Proteus Vulgaris*. La présence de l'hydroquinone pourrait être également décelée, mais la technique est plus délicate.

Les résultats acquis avec la salicine et l'arbutine, confirmant ceux que nous avons obtenus avec l'esculine, nous permettent de penser que les deux catégories de germes ont des caractères biochimiques assez particuliers.

Si leurs actions protéolytique et saccharolytique présentent de grandes analogies, ils doivent se différencier nettement par la réaction de Weil-Félix et par leurs modes d'action sur les milieux esculinés, salicinés et arbutinés.

Certaines difficultés s'opposant à l'emploi constant de la réaction d'agglutination, l'utilisation de l'esculine (en gélose citratée particulièrement) nous paraît un moyen commode et sûr pour distinguer les deux microbes l'un de l'autre.

ORIGINE DES SOUCHES DE PROTEUS

Nom de la Souche	Origine	Lieu de l'isolement	Date de l'isolement
Proteus Vulg. « M »....	Selles diarrhéiques de nourrisson (Metchnikoff)	(1)	1911
Proteus Vulg. « V »....	Viande de boucherie putréfiée (Valle-Miranda).		1917
Proteus Vulg. « I »....	matières fécales de rat (personnelle)	Lyon	1926
Proteus Vulg. « R »....	foie de rat (personnelle).	Lyon	1926
Proteus Vulg. « Berne ».	Laboratoire (Bornand) ..	Berne	
Proteus Vulg. « 3 L »...	Laboratoire (Bornand) ..	Lausanne	
Proteus Vulg. « 13 L »..	Laboratoire (Bornand) ..	Lausanne	
Proteus Vulg. « 18 L »..	(Bornand).....	Lausanne	
Proteus Vulg. « U »....	Urines de malade.....	Lyon	1925
Proteus Vulg. « T »....	Laboratoire (Lyon).....		
Proteus Vulg. « A »....	Eaux d'égout (person.)..	Lyon	1926
Proteus Vulg. « F »....	Eaux d'égout (person.)..	Lyon	1926
Proteus Vulg. « X »....	Eaux d'égout (person.)..	Lyon	1926
Proteus X19 « Metz »...			
Prot. X19 « Syrie »....			
Prot X19 « I P ».....	Institut Pasteur d'Alger..	Alger	
Prot. X19 « Sacquépée ».	(Sacquépée)		
Prot. X19 « Cocob. »....	Cocobacillus Byzantinensis (Bocquet).....		
Proteus « P »	foie de cobaye (person.) .	Lyon	1926

(1) Nous devons ces deux souches à l'obligeance de M. Albert BERTHELOT de l'Institut Pasteur.

CHAPITRE VI

Diagnose différentielle générale des bacilles au moyen des milieux à l'esculine.

L'esculine trouve-t-elle, en bactériologie, d'autres applications que celles que nous venons d'exposer dans les chapitres précédents ? Sans pouvoir tirer de son emploi des conclusions certaines, il semble qu'elle puisse constituer un élément de diagnostic différentiel des bactéries de réelle valeur.

Aussi, croyons-nous utile d'indiquer les résultats que nous a fournis l'ensemencement d'un grand nombre de microbes.

Dans cette série de recherches, la gélose citratée à l'esculine seule a été employée. La technique suivie est celle que nous avons signalée au début de ce travail. Les tubes ensemencés avec une culture microbienne en gélose, âgée de 24 heures, étaient mis à l'étuve à 37°,5 et surveillés de temps à autre pour noter, le cas échéant, la coloration noire indicatrice d'une réaction positive. En aucun cas, les cultures ne furent conservées plus de 48 heures à l'étuve.

La plupart du temps, la réaction se manifesta avec ses caractères typiques, et ne donna lieu à aucune difficulté

d'interprétation. Nous nous expliquons plus loin sur les anomalies présentées par un certain nombre de microbes, qui modifièrent le milieu esculiné de façon assez diverse, sans produire la teinte noire caractéristique.

Les résultats obtenus sont consignés dans les deux tableaux suivants : on trouvera dans le premier, les bacilles qui ont généralement déterminé le dédoublement de la gélose esculinée et dans le deuxième, ceux qui sont restés sans action sur le glycoside.

La classification ainsi établie est loin de posséder une valeur absolue ; elle permet seulement d'avoir une idée générale sur la réaction à l'esculine que présente ordinairement tel ou tel groupe microbien : les variations individuelles sont, en effet, assez nombreuses pour la plupart des espèces bactériennes ; et le fait ne paraît pas étrange, lorsqu'on considère que la réaction en cause est basée sur les phénomènes biochimiques si complexes qui président à la vie des infiniments petits.

1. *Microbes donnant généralement une réaction positive:*

	Virage au noir	Pas de virage	VIRAGE (1) INCOMPLET brunissement du milieu
Enterocoques	23	1	0
Bacillus entéritidis de GARTNER	1	0	1
Bacillus mésertericus niger	2	0	0
Colibacilles	32	19	0
Bacillus typhi murium	0	0	2
Bacillus lactis aérogènes	1	0	0
Pneumobacilles de FRIEDLANDER	7	2	0
Proteus X19	6	0	0
Bacillus subtilis	1	0	0

(1) Dans cette colonne sont indiqués les résultats d'échantillons qui modifient le milieu esculiné d'une manière atypique. Dans les commentaires qui suivent, on trouvera l'interprétation que l'on semble pouvoir donner à chacun d'eux.

2. Microbes donnant généralement une réaction négative:

	Pas de virage	Virage au noir	VIRAGE INCOMPLET brunissement au milieu
<i>Bacilles dysentériques :</i>			
Bacille de SHIGA	2	0	0
Bacille de STRONG	2	0	0
Bacille de FLEXNER	3	0	0
Bacille de HISS	2	0	0
<i>Bacilles diphtériques ou diphtériformes</i>			
Bacilles de LOEFFLER	7	0	0
Bacilles d'HOFFMAN	2	0	0
Bacillus cuti communis	2	0	1
<i>Vibrions :</i>			
Vibron cholérique	2	0	0
Vibron METCHNIKOWI	1	0	0
Vibron DAENEKI	1	0	0
Vibron FINKLER-PRIOR	1	0	0
<i>Bacilles typhiques et paratyphiques :</i>			
Bacille d'EBERTH	4	0	0
Bacille Para A	1	0	0
Bacille Para B	0	0	9
<i>Bacille de la septicémie des veaux de</i>			
THOMASSEN	1	0	0
<i>Bacillus fæcalis alcaligenes</i>	4	0	0
<i>Bacillus sui Pestifer III</i>	2	0	0
Bacille de la Psittacose	1	0	0
<i>Bacilles pyocanniques</i>	12	0	0
<i>Staphylocoques</i>	11	0	2
<i>Streptocoques</i>	21	1	0
<i>Pneumocoques</i>	6	0	0
<i>Proteus Vulgaris</i>	13	0	0
<i>Bactéridie charbonneuse</i>	3	0	0
<i>Bacille de la Pasteurellose aviaire</i>	1	0	0
<i>Bacille du Choléra des poules</i>	1	0	0
<i>Bacille du Rhinosclérome</i>	1	0	0
<i>Bacille du Muguet</i>	1	0	0

Ainsi qu'on peut le remarquer, la généralité des microbes que l'on rencontre fréquemment, soit à l'état naturel, soit à l'état pathologique, ne sont pas susceptibles de fournir une réaction positive. Les bacilles pyocanniques, les vibrions cholériques et autres, le *Bacillus fæcalis alcaligenes*, la Bactéridie charbonneuse, le *Bacillus sui Pestifer III*, le Bacille du Rhinosclérome ne possèdent aucune action fermentative sur les milieux à l'esculine.

Les staphylocoques ne se sont pas non plus montrés capables de dédoubler le glycoside. Deux échantillons toutefois, dont l'un provenait d'un pus de furoncle et l'autre d'arthrite, provoquèrent en 48 heures un léger brunissement de la gélose, qui ne s'accompagna d'aucune coloration particulière de la colonie. Sans pouvoir déterminer la cause de cette modification anormale, nous ne pensons pas qu'elle puisse être considérée comme une fermentation de l'esculine. Oscar KLOTZ et RANKIN ne signalent d'ailleurs aucun cas positif dans leur statistique qui porte, il est vrai, seulement sur cinq souches de Staphylocoques blancs ou dorés.

L'étude du groupe dysentérique, dont l'action reste constamment négative, ne permet pas de trouver un élément de différenciation quelconque entre le Shiga, le Hiss, le Strong ou le Flexner.

Les bacilles diphtériques vrais et les pseudo-diphtériques restent également sans action. Signalons toutefois qu'un échantillon de *Bacillus cuti communis*, d'origine inconnue, a produit, au bout de 48 heures d'étuve, des colonies jaunes à centre noir, sans aucune altération du milieu environnant.

Les microbes intestinaux nous ont donné des résultats assez variables.

Alors qu'un certain nombre de colibacilles produisent le dédoublement du glycoside en un temps très court, le Bacille d'EBERTH, le Paratyphique A et le Para B n'en provoquent nullement la décomposition. Avec cette dernière bactérie, cependant, après 48 heures de séjour à l'étuve, le milieu prenait une coloration légèrement brunâtre, mais en aucun cas, les colonies elles-mêmes ne présentèrent une modification quelconque de leur teinte primitive. Les 9 échantillons de Para Bensemencés, se comportèrent de façon identique.

Aussi, considérons-nous que le Para B, comme le Bacille d'EBERTH et le Para A, n'est pas susceptible de déterminer la fermentation du glycoside. Oscar KLOTZ et RANKIN sont arrivés aux mêmes conclusions : tous leurs échantillons de Para B (au nombre de treize) et de Bacille typhique (au nombre de dix neuf) fournirent une réaction négative. Ils isolèrent toutefois de la vésicule d'un sujet typhique, un organisme qui présenta sur les milieux de culture tous les caractères du Bacille d'EBERTH, mais qui ne fut jamais agglutiné à un taux normal par les différents sérums typhiques essayés à diverses reprises. Seul, cet échantillon donna une réaction colorée sur l'esculine au septième jour.

D'autres microbes appartenant au groupe des Salmonelloses restent également sans action sur les milieux préconisés par HARRISON et VAN DER LECK : ainsi le Bacille de la septicémie des veaux de THOMASSEN ou le Bacille de la psittacose.

Le *Bacillus enteritidis* de GARTNER, au contraire, semble se comporter de façon différente.

Des deux souches que nous ensemencâmes, l'une provoqua très nettement en 48 heures le noircissement de la gélose citratée, alors que l'autre montra une réaction beaucoup moins typique mais que nous croyons positive.

Sans vouloir tirer de ces faits isolés une conclusion hâtive, nous pensons qu'il serait intéressant de poursuivre à ce point de vue l'étude du Bacille de GARTNER. On sait, en effet, que les propriétés morphologiques et biologiques de cet agent pathogène sont exactement celles du Paratyphique B et que, seules, les réactions à l'égard des sérums le séparent de ce dernier. L'utilité d'un élément de diagnose différentielle entre ces deux bactéries, au moyen des milieux à l'esculine, ne serait donc pas contestable.

Quant au *Bacillus typhi murium* de LOFFLER, les deux souches examinées nous ont donné des colonies rougeâtres sans décoloration de la gélose environnante.

Enfin, nous devons signaler que la plupart des échantillons de Pneumobacilles de FRIEDLANDER étudiés, provoquèrent en moins de 18 heures un noircissement intense de l'agar esculiné. Deux d'entre eux, toutefois, l'un provenant d'un pus d'abcès, l'autre isolé d'une urine, se montrèrent incapables de produire le dédoublement du glycoside, même après un séjour de 48 heures à l'étuve.

Le fait nous paraît d'autant plus anormal que, dans tous les autres cas, l'agent pathogène a manifesté en

quelques heures une action fermentative particulièrement énergique. Il eut été intéressant de vérifier par l'examen de leurs caractères morphologiques et biologiques, l'identité certaine de ces deux échantillons. Il ne nous a malheureusement pas été possible de le faire.

En l'absence de toute donnée expérimentale sûre, nous pensons qu'il s'agissait peut-être, non pas de *Pneumobacilles* de FRIEDLÄNDER, mais de microbes très voisins ; et il serait, semble-t-il, pour le moins prématuré de conclure que certaines espèces de *Pneumobacilles* n'apportent aucune modification au milieu à l'esculine.

CONCLUSIONS

I. — Certains microbes possèdent la propriété de doubler l'esculine, glycoside extrait du marron d'Inde, en glucose et esculétine. Si l'on prépare des milieux renfermant cette substance et additionnés de sels de fer, l'esculétine, diphénol complexe, donne avec ces sels (citrate de fer) une réaction aboutissant au noircissement du milieu. Cette réaction, utilisée pour la première fois par HARRISON et VAN DER LECK pour la recherche du colibacille, peut trouver un plus large emploi en bactériologie, pour la diagnose différentielle des espèces.

II. — Contrairement aux assertions des auteurs précités, tous les colibacilles ne font pas virer le milieu au noir. La réaction s'est trouvée en défaut pour 19 échantillons examinés sur 51, c'est-à-dire dans presque un tiers des cas. OSCAR KLOTZ et RANKIN sont arrivés à un résultat analogue.

III. — Les milieux à l'esculine peuvent servir au diagnostic différentiel des membres du groupe strepto-enteropneumocoque ; l'entérocoque les faisant virer au noir, le streptocoque donnant des cultures sans noircissement, le pneumocoque ne s'y développant pas. Deux exceptions concernant une fois l'enterocoque et une fois le streptocoque ont été relevées sur plus de cinquante échantillons. Le fait a été confirmé par MOLLIEUX, A. DUFOURT, etc.

IV. — Nous avons vu que ces mêmes milieux paraissent également pouvoir servir à différencier les *Proteus* X19 des nombreuses autres variétés de cette espèce si protéiforme. Six échantillons de *Proteus* X19 de diverses origines nous ont toujours donné une réaction positive, alors que 13 échantillons de divers autres *Proteus* ne nous ont jamais donné une réaction positive. KLOTZ et RANKIN ont obtenu 9 résultats négatifs sur 10 échantillons de *Proteus*, sans en préciser la nature. Sur 24 échantillons de « Bacille de Hauser » isolés de matières fécales, Aimée HOROWITZ n'obtint pas une seule fois une réaction positive.

Il serait utile avant de conclure définitivement d'examiner un plus grand nombre de souches.

V. — Parmi les autres microbes donnant une réaction positive très nette, pouvant être ajoutée à la liste de leurs caractères d'identification, nous citerons : le Pneumobacille de FRIEDLANDER, le *B. typhi murium*, le *Bacillus mesentericus niger*, le *B. enteritidis* de GARTNER et le *Bacillus lactis aërogenes*. Pour cette dernière bactérie, le fait avait été déjà signalé par Oscar KLOTZ et RANKIN.

Le Président de la Thèse,
PAUL COURMONT.

VU : Le Doyen,
JEAN LÉPINE.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Lyon, le 15 Avril 1927.

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,

Pour le Recteur et par délégation :

Le Doyen de la Faculté de Médecine,
JEAN LÉPINE.

BIBLIOGRAPHIE

- A. E. BERDNIKOV. — Sur les bactéries du groupe *Proteus* (*Journal de microbiologie*. Pétrograd, T. 1, n° 3-5, 1914).
- A. BERTHELOT. — Recherches sur quelques caractères du *Proteus Vulgaris*. (*Thèse de Paris* 1913).
- A. BESSON. — Technique microbiologique et sérothérapique. (1924, T. II, page 956).
- A. BESSON et G. EHRINGER. — Le *Bacillus Proteus* (*Proteus Vulgaris*). (*Paris Médical*, 10 mars 1923, pages 225-229).
- Ch. CANTU. — Le *Bacillus Proteus*, sa distribution dans la nature (*Annales de l'Institut Pasteur*, T. XXV, Novembre 1911, page 852 et suivantes).
- P. COURMONT et A. ROCHAIX. — Variations « in vitro » de la fermentation des sucres par les bacilles du groupe dysentérique. (*Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, T. XXII, N° 2, Avril 1924, pages 377-388).
- DIETRICH. — Beitrage zur Weil-Felixchen Reaktion beim Fleckfieber. (Institut. malad. infect. R. Koch Berlin). *Deutsche mediz. Woch.*, 21 décembre 1916, pages 1570-1573).
- DOPTER et SACQUÉPÉE. — *Précis de bactériologie*. (Baillièrre, édit., 1921).
- Léon FELTZ. — Le *Proteus Vulgaris* Hauser (*Thèse de Pharmacie*, Paris, 1900).
- G. FICAL. — Osservazioni sul tifo essantematico e sulla reazione di Weil-Felix (*Ann. d'Igiene*, T. XXIX, 31 mars 1919, pages 145-148).

- E. FRIEDBERGER et G. JOACHIMOGLU. — (*Instil. hïgien. Univers. Greifswald*). Ueber einen Nährboden zur Züchtung des *Bazillus typhi exanthematici* *Bazillus Proteus* X Weill-Felix. (*Münch. mediz. Woch.*, 23 Juillet 1918, pages 805-807).
- GAILLARD. — Contribution à l'étude chimique du groupe *Proteus*. (*Thèse de Médecine*, 1897).
- F. C. HARRISSON and J. VAN DERLECK. Aesculin Bile Salt Media for Water and Milk Analysis. (*Royal Society of Canada third series*, 1908-1909, Volume II, Section IV, Pages 105-110).
- A study of some organisms which produce black fields in aesculin-bilesalt media. (*Séries III*, Volume IX, pages 207-217. *Royal Society of Canada*).
 - Aesculin bilesalt media for the isolation of *B. Coli* and *B. typhosus*. (*Proceedings and Transactions of the Royal Society of Canada*, 1909, Volume III, section IV).
 - Aesculin bilesalt media for water analysis. (*Centralblatt für Bakteriologie*, II, Abt. 22, pages 547-551, 1909).
- C. A. HERTER et Carl ten BROECK. — A biochemical study of *Proteus Vulgaris* Hauser (*Journal of biological Chemistry*, T. IX, Juillet 1911, page 491).
- Aimée HOROWITZ. — Contribution à l'étude du genre *Proteus Vulgaris* (*Annales de l'Institut Pasteur*, T. XXX, Juillet 1916, pages 307-318).
- Oscar KLOTZ et RANKIN. — The reaction of various bacteria upon Aesculin agar (*The Journ. of Infectious Diseases*, Volume VII, Janvier 1910, pages 67-72).
- LEIBORIUS. — In die Mikroorganismen de Flugge, 1896.
- LÖHNIS. — Précis de Bactériologie agricole (Traduit de l'allemand par H. KÜFFERATH, Bruxelles, 1912, page 86).
- LOMRY et GILLET. — Notes sur l'identification des bacilles pa-

- thogènes de l'intestin (*Bulletin de l'Académie Royale de Médecine de Belgique*, 1 Décembre 1922, 11 Juillet 1923).
- V. MASSI. — Modo di vegetare del bacterium coli su alcuni terreni di cultura con glucosidi. (*Revidi Igiene di San. pubbl.*, T. XXII, n° 4, 16 Février 1911, page 101).
- P. MOLLIEUX. — Analyse bactériologique des eaux potables. Pages 111 et 112. (Paris, le François, 1925).
- A. MONZIOIS et E. DUBOURG. — Agglutination du Proteus X19 dans le typhus exanthématique. (*C. R. Société Biol.*, T. LXXXII, 5 Avril 1919, page 348).
- B. POMME. — Les bacilles paradysentériques. (*Thèse de Médecine*, Lyon, 1920).
- A. ROCHAIX. — Recherche rapide de la contamination bactériologique des eaux de boisson (*Revue d'Hygiène*, 1917, 89, page 472).
- Milieux à l'esculine et colibacille. *Comptes-rendus de la Société de Biologie de Lyon*, Novembre 1923, T. LXXXIX, page 1042).
- Milieux à l'esculine pour le diagnostic différentiel des Bactéries du groupe Strepto-Entéro-Pneumocoque. (*C. R. de la Société de Biologie de Lyon*, Mars 1924, T. XC, page 771).
- La recherche du colibacille dans l'eau et dans le lait au moyen des milieux à l'esculine (*Le lait*. N° 37, pages 541-544, 1924).
- Standardisation des méthodes d'analyse bactériologique des eaux (*Revue d'Hygiène*, T. XLVII, n° 12, Décembre 1925, page 1148).
- A. ROCHAIX et H. SARDA. — Quelques caractères biochimiques du Proteus X19 (*C. R. de la Société de Biologie de Lyon*, Juillet 1926, T. XCV, page 841).
- P. SEDAILLAN. — Culture du Streptocoque dans les milieux à

- l'arbutine (*C. R. de la Société de Biologie de Lyon*, 1924, T. XCI, page 686).
- Etudes sur des Streptocoques hémolytiques pathogènes pour l'homme, (*Thèse de Médecine*, Lyon, 1925).
- L. SILBER. — Über die Herkunft der X. Proteen und ihr Zusammenhang mit der Weil-Felixschen Reaktion. (*Centralbl. für Bakt. I.*, T. XCI, page 191, 1924).
- Über das Wesen der Weil-Felixschen Reaktion. (*Centralbl. für Bakt. I.*, T. LXXXIX, page 250, 1923).
- Th. SMITH. — Modifications temporary and permanent of the physiological characters of bacteria in mixed cultures (*Trans. itss. of Amer. Phys.*, IX, 1894, pages 567-599).
- G. VALLE-MIRANDA. — Contribution à l'étude du *Proteus Vulgaris* Hauser (Recherches biochimiques comparées sur une race pathogène et une race saprophyte). (*Thèse des Sciences*, Paris, 1917).
- E. WEIL et A. FELIX. — Untersuchungen über das Wesen der Fleckfieber agglutination. (*Wien. klin. Woch.*, 27 Mars 1917 pages 393-399).
- WILSON. — Typhus fever and so-called Weil-Felix reaction (*Brit. Médic. Journal*, 16 Juin 1917, pages 825-826).
- WURTZ — Dictionnaire de chimie.
-

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE PREMIER. — Historique	7
CHAPITRE II. — Etude de la réaction chimique et technique de la préparation des milieux de culture	10
CHAPITRE III. — Application des milieux à l'es- culine à la détection des colibacilles dans l'eau et dans le lait	20
CHAPITRE IV. — Application des milieux à l'es- culine au diagnostic différentiel des Bactéries du groupe strepto-entéro-pneumocoque	23
CHAPITRE V. — Application des milieux à l'es- culine au diagnostic différentiel du « <i>Proteus</i> X19 »	26
CHAPITRE VI. — Diagnose différentielle géné- rale des bacilles au moyen des milieux à l'es- culine	60
CONCLUSIONS	67
BIBLIOGRAPHIE	69

LYON
ÉDITIONS DU SERVICE PHOTOGRAPHIQUE
DE L'UNIVERSITÉ

